

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 9 月 12 日 (12.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/070010 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/52, 31/573, 38/13, 31/7056, 31/436, 31/365, 31/16, 38/02, 39/395, 31/711, 31/7105, A61P 37/06
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00930
- (22) 国際出願日: 2002 年 2 月 5 日 (05.02.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-56209 2001 年 3 月 1 日 (01.03.2001) JP  
特願2001-56216 2001 年 3 月 1 日 (01.03.2001) JP  
特願2002-8028 2002 年 1 月 16 日 (16.01.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO, INC.) [JP/JP]; 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 盛一 (SUZUKI, Seiichi) [JP/JP]; 〒102-0074 東京都千代田区九段南 4-8-3-1 105 Tokyo (JP). 磯部 光章
- (ISOBE, Mitsuki) [JP/JP]; 〒162-0831 東京都新宿区横寺町 5 1-4 06 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GRAFT REJECTION INHIBITORS

(54) 発明の名称: 移植片拒絶反応抑制剤

(57) Abstract: It is found out that an antibody against AILIM (also called ICOS and 8F4) and AILIM-Ig have a significant therapeutic effect of inhibiting or preventing graft rejection which is a serious problem in transplanting tissues or organs (homoplasy and heteroplasty) performed for treating failures in various organs (liver, heart, lung, kidney, pancreas, etc.).

(57) 要約:

AILIM (ICOS 及び 8F4 と呼ぶ) に対する抗体及び AILIM-Ig が、種々臓器 (肝臓、心臓、肺、腎臓、膵臓など) の不全症の治療のために施される組織や臓器の移植 (同種移植または異種移植) において深刻な問題となっている移植片拒絶反応に抑制または予防に対して有意な治療効果を有することを見出した。

WO 02/070010 A1

## 発明の名称

## 移植片拒絶反応抑制剤

技術分野

本発明は、AILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule ; 別名を「ICOS (inducible co-stimulator) 」という。) の生物活性、特にAILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

具体的には、本発明は、AILIM発現細胞の増殖を制御（例えば抑制）するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカイン（例えば、インターフェロン $\gamma$ またはインターロイキン4など）の産生を制御（例えば抑制）する活性を有する物質を含んでなる医薬組成物に関する。

さらに具体的には、本発明は、（1）臓器若しくはその一部または組織の移植に伴う移植片拒絶反応（免疫拒絶反応）を抑制、治療または予防するための医薬組成物、並びに（2）免疫抑制剤による臓器若しくはその一部または組織の移植に伴う移植片拒絶反応（免疫拒絶反応）の抑制、治療または予防の効果を増大するための医薬組成物に関する。

背景技術

昨今の臓器移植法の改正により、我が国においても数例の脳死患者からの臓器移植が行われている。その内の1例では、1人のドナーから、7名の患者がその恩恵を受けた。今後は我が国においても臓器移植の増大が期待される。

一方、我が国においては、重篤な循環器系の疾患、例えば、肝臓疾患（急性肝不全、肝硬変など）、心臓疾患（重症心不全、心筋症、心臓肥大症など）、腎臓疾患（腎不全、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎盂腎炎など）、肺疾患（両肺

機能不全など）、及び膵臓疾患（糖尿病患者の治療）などに罹患しその治療のために臓器の移植を必要とする患者が、毎年、心臓で約600人、肝臓で約3,000人、また肺で約500人ずつ増加していると推定されている。上述した法的側面での整備が整う一方で、移植され得る臓器の不足も現実的な問題として存在する。移植先進国である米国においても同様に臓器の不足が深刻な問題となっており、米国では心臓移植で約4,300人（1999年）また腎臓移植で約43,000人（1999年）が移植を待ち続けており、それぞれ毎年約800人及び約2,300人が移植を受けられないままこの世を去っているのが実状である。

組織（皮膚、角膜及び骨などの組織）または臓器（肝臓、心臓、腎臓、肺、膵臓など）の移植には、（1）自家移植（自己移植）、（2）同系移植、（3）同種移植、及び（4）異種移植がある。

自家移植（自己移植；autotransplantation）は、1つの個体の一部を同じ個体の他の部分に移植するものであり、例えば、火傷の治療のための自身の正常な皮膚を損傷部位に移植する場合がそれにあたる。

同系移植（isotransplantation）は、同じ均一系の動物の間で行われる移植であり、ヒトにおいては、一卵性双生児の間で行われる移植（例えば、腎臓の片方や肝臓組織などの移植）である。

同種移植（allotransplantation）は、遺伝原組成が異なる2つの個体間で行われる移植であり、ヒトにおいては、二卵性双生児の間での移植や、全く血縁関係のない個体間での移植がこれにあたる。

異種移植（xenotransplantation）は、互いに異なる動物種である個体間での移植であり、例えば、チンパンジーやブタの組織や臓器をヒトに移植する場合がこれにあたる。

臓器移植に関する法整備により脳死患者からの同種移植の増大が見込まれることは上述したとおりであるが、移植臓器の絶対的な不足を解消すべく最近では異種動物、即ちブタなどの非ヒト哺乳動物からヒトへの組織や臓器の移植の実用化

に向けた様々な検討が活発になってきている

移植され得る組織や臓器の不足の問題が上述のような脳死移植法の整備並びに異種移植技術の発達で解消されることが期待される一方で、同種移植及び異種移植による疾患治療においてはもう一つの極めて大きなハードルが存在する。即ち、ドナーからの移植組織や臓器をレシピエントに移植した後に起こるレシピエント患者における重篤な免疫拒絶反応（移植片拒絶反応（graft rejection））である。

移植片拒絶反応は、移植片（移植される生体の一部であり、細胞、組織または臓器）のドナーのレシピエントの遺伝的背景が異なる場合（即ち、同種移植または異種移植）、移植片がレシピエントによって異物と認識されることによりレシピエントの免疫系がその移植片を拒絶し排除しようとする様々な免疫反応である。この移植に伴うこの免疫反応は、（1）移植直後に起こる強い拒絶反応である超急性拒絶反応（hyper-acute rejection reaction）、（2）移植後数ヶ月以内に見られる急性拒絶反応（acute rejection reaction）、（3）移植後数ヶ月以降に見られる慢性拒絶反応（chronic rejection reaction）に分けられる。また、T細胞に代表される免疫担当細胞による細胞性免疫と抗体による液性免疫が複雑に連携した形で起こるが、主としては細胞性免疫である。

この移植片拒絶反応により、移植片は最終的には壊死脱落する。また、レシピエントには、発熱、白血球増多、倦怠感などの重篤な全身症状だけでなく、移植局所の腫脹や圧痛が起こる。さらには、感染症などの重篤な合併症を引き起こすこととなる。

とりわけ、ブタなどの異種の移植片をヒトに移植する場合には、超急性拒絶反応が起こり移植片が分単位で拒絶されてしまうという大きな問題が存在する。

このような移植に伴う免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）を抑制するためには、同種移植により惹起される免疫拒絶反応が主として細胞性免疫によるものであることから、免疫担当細胞の機能を抑制する限られたいくつかの免疫抑制剤が用い

られている。例えば、サイクロスポリン (cyclosporin; CsA)、タクロリムス (tacrolimus; FK-506)、アザチオプリン (azathioprine; AZ)、ミコフェノール酸モフェティル (mycophenolate mofetil; MMF)、ミゾリビン (mizoribine; MZ)、レフルノマイド (leflunomide; LEF)、プレドニゾロン (prednisolon) やメチルプレドニゾロン (methylprednisolon) などの副腎皮質ステロイド (別称: 副腎皮質ホルモン; コルチコステロイド (corticosteroid); コルチコイド (corticoid))、シロリムス (sirolimus) (別称: ラパマイシン (rapamycin))、デオキシスパーガリン (deoxyspergualin; DSG) 及び FTY720 (化学名称: 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]-1,3-propanediol hydrochloride) などである。

また、T細胞の活性化に必要なコスティミュレイトリーシグナルの伝達を担う分子 (副刺激伝達分子) である CTLA4 や CD28、特に CTLA4 の可溶性領域やそれをコードする遺伝子を用いる CTLA4 医薬も免疫抑制剤として臨床開発中である。

一方、最近になって、コスティミュレイトリーシグナル伝達分子である CTLA4 や CD28 と同様に、当該 T 細胞等のリンパ球の活性化に必須な第 2 のシグナル (コスティミュレイトリーシグナル) の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化 T 細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う第 3 の副刺激伝達分子として AILIM (activation inducible lymphocyte immunomodulatory molecule; ヒト、マウス及びラット; Int. Immunol., Vol.12, No.1, p.51-55, 2000; 別称を ICOS という (Inducible co-stimulator; ヒト; Nature, Vol.397, No.6716, p.263-266, 1999); J. Immunol., 166(1), p.1, 2001; J. Immunol., 165(9), p.5035, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun., 276(1), p.335, 2000; Immunity, 13(1), p.95, 2000; J. Exp. Med., 192(1), p.53, 2000; Eur. J. Immunol., 30(4), p.1040, 2000) と呼ばれる分子が同定された。

この分子に関する最近の研究に基づく知見から、この AILIM 分子は、T細胞などの免疫担当細胞 (特に T細胞) の活性化を通じて引き起こされる種々の疾患 (例えば、自己免疫疾患、アレルギー、炎症など) に関与する可能性が予測されてい

るが、このAILIM分子の機能の制御と組織や臓器の移植に伴う移植片拒絶反応（免疫拒絶反応）との関係、並びに当該AILIM分子の活性を制御することによるそのような組織や臓器の移植に伴う拒絶反応の抑制、治療または予防の試みについては何ら報告されていない。

また、極最近になって、この副刺激伝達分子AILIMと相互作用するリガンドと考えられるB7h、B7RP-1、GL50あるいはLICOSと称される新規分子も同定されている（Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000）。

これら2種類の新規な分子、即ち、AILIM（ICOS）とB7RP-1（B7h, GL50, LICOS）の同定により、上述したT細胞等のリンパ球の活性化及び活性化T細胞の機能制御に必須であるコスティミュレイトリーシグナルの伝達経路には、これまで知られていたCD28とCD80(B7-1)/CD86(B7-2)との間のシグナル伝達経路、及びCTLA4とCD80(B7-1)/CD86(B7-2)との間のシグナル伝達経路である第一及び第二の経路の他にAILIM（ICOS）とB7RP-1（B7h, GL50, LICOS）との相互作用による新しい第三の経路があることが判明することとなった。

この新しい2つの分子の各々の生物学的機能、該分子による第三のコスティミュレイトリーシグナル伝達によるT細胞等のリンパ球の機能制御、並びに該新規なシグナル伝達と疾患との関連性については、目下精力的に研究が進められているところである。

#### 発明の開示

即ち、本発明は、T細胞等のリンパ球の活性化に必須な第2のシグナル（コスティミュレイトリーシグナル）の伝達、並びに該シグナルに連動して活性化T細胞等の活性化リンパ球の機能制御を行う分子であると考えられる新規分子AILIMの生物学的機能を、医学及び薬学的手法（例えば、低分子化合物及び抗体等の薬

剤)により制御することにより、組織や臓器の移植(同種移植または異種移植)における免疫拒絶反応(移植片拒絶反応)を抑制、治療または予防する方法及び薬剤を提供することを目的とする。

さらには、そのようなAILIMの生物学的機能を制御する薬剤(例えば、低分子化合物及び抗体等の薬剤)を用いて、既存の免疫抑制剤(サイクロスポリン、アザチオプリン、副腎皮質ステロイド、FK-506など)による移植片拒絶反応の抑制効果を増大させる方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、哺乳動物のAILIMの生物学的機能、並びに移植片(細胞、組織、臓器)の移植(同種移植または異種移植)に伴う深刻な問題である免疫拒絶反応(移植片拒絶反応)を抑制する方法に関して鋭意研究を重ねた結果、(1) AILIMの機能を制御する薬剤が組織や臓器の移植に伴う免疫拒絶反応(移植片拒絶反応)を有意に抑制すること、並びに(2) 既存の免疫抑制剤による移植片拒絶反応の抑制の効果が、AILIMの機能を制御する薬剤を用いることにより増大されることを、見出し本発明を完成するに至った。

本発明の医薬組成物は、AILIMを発現する細胞へのAILIMを介するコストイミュレイトリーシグナル(副刺激シグナル)の伝達が関与する種々の生体反応(例えば、AILIMを発現する細胞の細胞増殖、AILIMを発現する細胞によるサイトカインの産生、AILIMを発現する細胞の免疫細胞溶解(immune cytotoxicity)若しくは細胞死(apoptosis)、及びAILIMを発現する細胞に対する抗体依存性細胞障害を誘導する活性など)を制御するための医薬品として、及び/または該AILIMを介するシグナル伝達に関与する種々の疾患の発症及び/または進行を抑制、阻止し、該疾患を治療または予防するための医薬品として有用である。

具体的には、本発明の医薬組成物は、AILIM発現細胞の増殖の制御(抑制または促進)またはAILIM発現細胞によるサイトカイン(例えば、インターフェロン $\gamma$ またはインターロイキン4など)の産生を制御(抑制または促進)することが可能であり、AILIMを介するシグナル伝達に関与する様々な生理現象により惹起



される種々の病的状態の抑制、及び種々の疾患の治療または予防を可能にする。

本発明の医薬組成物を用いることにより、重篤な循環器系疾患に罹患しているレシビエントのドナーの臓器（肝臓、心臓、肺、腎臓、膵臓など）若しくはその一部または組織（皮膚、角膜、骨などの組織）を移植（同種移植または異種移植）による治療における深刻な問題である免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）を抑制、予防及び／または治療することが可能である。

さらには、本発明の医薬組成物を用いることにより、そのような移植治療での免疫拒絶反応の抑制のために施されている既存の免疫抑制剤による移植片拒絶反応の抑制の効果を増大させることが可能である。

即ち、本発明は、下記(1)乃至(11)に記載されるとおりの発明である。

(1) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、臓器若しくはその一部または組織の移植に伴う移植片拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物。

(2) AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、1または複数の免疫抑制剤による臓器若しくはその一部または組織の移植に伴う移植片拒絶反応の抑制、治療または予防の効果を増大するための医薬組成物。

(3) 該免疫抑制剤が、アザチオプリン、副腎皮質ステロイド、サイクロスポリン、ミゾリビン及びタクロリムス（FK-506）、ミコフェノール酸モフェティル、レフルノマイド、シロリムス、デオキシスパーガリン、FTY720及びCTLA4医薬から選ばれる1または複数の薬剤であることを特徴とする前記(2)に記載の医薬組成物。

(4) 該移植が、同種移植であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載の医薬組成物。

(5) 該移植が、異種移植であることを特徴とする前記(1)乃至前記(3)のいずれかに記載の医薬組成物。

(6) 該臓器が、肝臓、心臓、腎臓、肺または脾臓であることを特徴とする前記 (1) 乃至前記 (5) のいずれかに記載の医薬組成物。

(7) 該組織が、皮膚、角膜または骨の組織であることを特徴とする前記 (1) 乃至前記 (5) のいずれかに記載の医薬組成物。

(8) 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする前記 (1) 乃至前記 (7) のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする前記 (8) に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

(10) 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする前記 (1) 乃至前記 (7) のいずれかに記載の医薬組成物。

(11) 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする前記 (10) に記載の医薬組成物。

以下、本発明で用いられる語句の意味、並びに物質の製造方法を明らかにすることにより、本発明を詳細に説明する。

本発明における「哺乳動物」とは、ヒト、ウシ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、及びモルモット等を意味し、好ましくは、ヒト、ウシ、ラット、マウスまたはハムスターであり、特に好ましくは、ヒトである。

本発明でいう「AILIM」とは、Activation inducible lymphocyte immunomodulatory moleculeの略称であり前述に記載したとおりの既報に報告される構造及び機能を有する哺乳動物の細胞表面分子を意味する (J. Immunol., 166(1), p.1, 2001; J. Immunol., 165(9), p.5035, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun.,

276(1), p.335, 2000; Immunity, 13(1), p.95, 2000; J. Exp. Med., 192(1), p.53, 2000; Eur. J. Immunol., 30(4), p.1040, 2000; Int. Immunol., 12(1), p.51, 2000; Nature, 397(6716), p.263, 1999; GenBank Accession Number: BAA82129 (ヒト) ; BAA82128 (ラット) ; BAA82127 (ラット変異体) ; BAA82126 (マウス) )。

特に好ましくはヒト由来のAILIMを意味する (例えば、International Immunology, Vol.12, No.1, p.51-55, 2000。

なお、このAILIMは、ICOS (Nature, Vol.397, No.6716, p.263-266, 1999) またはJTT-1抗原/JTT-2抗原 (日本国特許出願公開平11-29599号公報 ; 国際特許出願公開W098/38216号公報) と同別称されるが、それらの分子は互いに同一の分子を意味する。

また、本発明で言う「AILIM」には、該既報の文献中に記載された各々の哺乳動物のAILIMのアミノ酸配列、特に好ましくはヒトAILIMのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。さらにまた、既に同定されているラット由来のAILIM変異体 (GenBank Accession Number: BAA82127) と同様のヒトAILIM変異体も本発明における「AILIM」に包含される。

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有する」とは、該既報のアミノ酸配列を含むポリペプチドと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が置換、欠失及び/または修飾されているアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びに該アミノ酸配列に、複数個のアミノ酸、好ましくは1乃至10個のアミノ酸、特に好ましくは1乃至5個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも本願発明の「AILIM」の範囲に包含されることを意味する。

そのようなアミノ酸の置換、欠失、または挿入は常法に従って行うことができる (実験医学別冊・「遺伝子工学ハンドブック」(1992)など)。

例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法 (gapped duplex) 法、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、Ba131酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキャニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。

合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法は、例えば下記のように行うことができる。アンバー変異をもつM13ファージベクターに変異誘起を希望する領域をクローニングし、一本鎖ファージDNAを調製する。アンバー変異をもたないM13ベクターのRFIDNAを制限酵素処理により線状とし、上記の一本鎖ファージDNAと混合して変性後、アニールさせ、「gapped duplex DNA」を形成させる。これに変異を導入した合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼの反応により閉環状2本鎖DNAとする。このDNAをミスマッチ修飾能が欠損している大腸菌mutS株にトランスフェクションし、増殖したファージをサブレッサー機能のない大腸菌に感染させ、アンバー変異を持たないファージだけを選択する。

また、亜硝酸による点突然変異を導入する方法は、例えば下記のような原理を利用する。DNAを亜硝酸処理すると塩基が脱アミノ化されて、アデニンのはヒポキサンチンに、シトシンはウラシルに、グアニンはキサンチンになる。脱アミノ化されたDNAを細胞に導入すると、DNA複製時にヒポキサンチンはシトシンと、ウラシルはアデニンとキサンチンはチミンと塩基対を形成するため、「A:T」が「G:C」へ、「G:C」が「A:T」へと置換する。実際には亜硝酸処理した一本鎖DNA断片を「gapped duplex DNA」にハイブリダイズさせ、以下、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法と同様に操作して変異株を分離すればよい。

本発明を構成する「AILIM発現細胞によるサイトカインの産生」における「サイトカイン」とは、AILIMを発現する細胞（特に、T細胞）が産生する任意のサ

イトカインを意味する。

該T細胞は、Th1タイプのT細胞及びTh2タイプのT細胞が挙げられ、本発明における該サイトカインは、特にそれらTh1タイプのT細胞が産生するサイトカイン及び／またはTh2タイプのT細胞が産生する任意のサイトカインを意味する。

Th1タイプのT細胞が産生するサイトカインとしては、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF、IL-3などが挙げられ、またTh2タイプのT細胞が産生するサイトカインとしては、IL-3、IL-4、IL-5、IL-10、TNFなどが挙げられる（細胞、Vol.30, No.9, p.343-346, 1998）。

本発明を構成する「物質」、具体的には「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」、さらに具体的には「AILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIM発現細胞によるサイトカインの産生を抑制する活性を有する物質」には、自然界に存在する天然の物質あるいは人工的に調製される任意の物質を意味する。

ここで、「AILIMを介するシグナル伝達」とは、上述または後述する実施例で詳述するようなAILIMを発現する細胞に任意の表現型の変化（細胞増殖、細胞の活性化、細胞の不活性化、細胞死、及び／またはAILIM発現細胞からの任意のサイトカインの産生能の変化）をもたらすようなAILIMを通じたシグナル伝達を意味する。

該「物質」は、「蛋白性物質」と「非蛋白性物質」に大別することができる。

該「蛋白性物質」としては、後述するポリペプチド、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体または該モノクローナル抗体の一部）が挙げられる。

該物質が抗体である場合には、好ましくはモノクローナル抗体である。該物質がモノクローナル抗体である場合には、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体だけでなく、後述する組換えキメラモノクローナル抗体、組換えヒト型モノクローナル抗体及びヒトモノクローナル抗体が包含される。

該物質が、ポリペプチドである場合には、後述するポリペプチド、該ポリペプ

## 12

チドの断片（オリゴペプチド）、融合ポリペプチド、及びそれらいずれかの化学修飾体が包含される。オリゴペプチドとしては、5乃至30個のアミノ酸、好ましくは5乃至20個のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。該化学修飾は、生体に投与された場合の血中半減期の増大あるいは経口投与時における消化管での分解に対する耐性若しくは吸収性の増大の目的等の種々の目的に応じて設計することができる。

該ポリペプチドの具体例としては、後述する下記が挙げられる。

- (1) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- (2) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；または、
- (3) AILIMに結合するポリペプチド。

該「非蛋白性物質」としては、DNA、RNA及び化学的に合成された化合物が挙げられる。

ここで、「DNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするDNA（cDNA及びゲノミックDNAを含む）の塩基配列を基に設計されるアンチセンスDNA医薬として有用な「該DNAの部分塩基配列を含むDNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾DNA」を意味する。即ち、該アンチセンスDNAは、AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

また、該DNAをアンチセンス医薬として用いる場合には、該DNAが患者の

体内に投与された場合の血中半減期の増大（安定性）、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該DNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、オリゴヌクレオチドの構造中のリン酸結合、リボース、核酸塩基、糖部位、3'及び/または5'末端等の化学修飾が挙げられる。

リン酸結合の修飾としては、1以上の該結合を、ホスホジエステル結合（D-オリゴ）、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合（S-オリゴ）、メチルホスホネート結合（MP-オリゴ）、ホスホロアミデート結合、非リン酸結合及びメチルホスホノチオエート結合のいずれかまたはそれらの組み合わせへの変更を挙げることができる。リボースの修飾としては、2'-フルオロリボースあるいは2'-O-メチルリボースへなどへの変更を挙げることができる。核酸塩基の修飾としては、5-プロピニルウラシルまたは2-アミノアデニンなどへの変更が挙げられる。

ここで、「RNA」とは、前述のAILIM（好ましくはヒトAILIM）をコードするRNAの塩基配列を基に設計されるアンチセンスRNA医薬として有用な「該RNAの部分塩基配列を含むRNAあるいはそれらを化学修飾した化学修飾RNA」を意味する。該アンチセンスRNAは、AILIMをコードするDNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることにより、該AILIMをコードするDNAのmRNAへの転写あるいは該mRNAの蛋白への翻訳を阻害することができる。

ここで、「部分塩基配列」とは、任意の部位における任意の数の塩基からなる部分塩基配列を意味する。該部分塩基配列としては、連続した5乃至100塩基の部分塩基配列が挙げられ、好ましくは、連続した5乃至70塩基の部分塩基配列、さらに好ましくは連続した5乃至50塩基の部分塩基配列、より好ましくは連続した5乃至30塩基の部分塩基配列が挙げられる。

該アンチセンスRNAは、該RNAが患者の体内に投与された場合の血中半減

期の増大、細胞内膜の透過性の増大、あるいは経口投与の場合の消化器官での分解耐性の増大若しくは吸収の増大などの目的のために、該RNAの塩基配列の一部に化学修飾を施すことが可能である。化学修飾としては、例えば、前述のアンチセンスDNAに適用されるような化学修飾を挙げることができる。

「化学的に合成された化合物」とは、上述のDNA、RNA及び蛋白性物質を除く任意の化合物であって、分子量約100乃至約1000以下の化合物、好ましくは分子量約100乃至約800の化合物であり、より好ましくは分子量約100乃至約600の化合物を挙げることができる。

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」とは、AILIM（好ましくはヒトのAILIM）を構成するポリペプチド鎖の一部（断片）を意味し、好ましくはAILIMを構成するポリペプチドの細胞外領域の全部またはその一部を意味する（該領域は所望に応じそのN末端及び／またはC末端に1乃至5のアミノ酸が付加されていてもよい。）。

本発明に係るAILIMは、1または2のポリペプチド鎖により構成される細胞膜を貫通する細胞膜貫通分子である。

ここで「細胞膜貫通蛋白」とは、多くの受容体あるいは細胞膜表面分子に見られるように、膜の脂質二重層を1回または数回貫通する疎水性ペプチド領域により膜と連結し、全体として細胞外領域(extracellular region)、膜貫通領域(transmembrane region)及び細胞質領域(cytoplasmic region)の3つの主領域から構成される構造をとる蛋白を指す。さらにそのような膜貫通性蛋白は、モノマー(monomer)として、または、同一のアミノ酸配列を有するもう1本の鎖あるいは異なるアミノ酸配列を有する鎖とともにそれぞれホモダイマー(homodimer)、ヘテロダイマー(heterodimer)あるいはオリゴマー(oligomer)を形成して存在することにより、各々の受容体や細胞表面分子を構成する。

ここで「細胞外領域」とは、前述のような細胞膜膜貫通蛋白の全体構造のうち、該膜蛋白が連結している膜の外界側に存在する部分構造（部分領域）の全部ま



たは一部を意味し、換言すれば、膜内に取り込まれている領域（膜貫通領域）及び該膜内の領域に引き続いて細胞質内に存在する領域（細胞内領域）以外の領域の全部または一部を意味する。

前述の「蛋白性物質」に包含される「融合ポリペプチド」とは、AILIM（好ましくはヒトのAILIM）を構成するポリペプチドの細胞外領域の全部または一部と「免疫グロブリン（Ig、好ましくはヒトのIg）の重鎖の定常領域の全部または一部」とからなる融合ポリペプチドである。好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖の定常領域の一部との融合ポリペプチドであり、特に好ましくはAILIMの細胞外領域とヒトIgGの重鎖のヒンジ領域、C<sub>H</sub>2ドメイン及びC<sub>H</sub>3ドメインからなる領域（Fc）との融合ポリペプチドである。なお、IgGとしては、IgG1が好ましい。また、AILIMとしては、ヒト、マウスまたはラット（好ましくはヒト）のAILIMが好ましい。

ここで「免疫グロブリン（Ig）の重鎖の定常領域の全部または一部」とは、好ましくはヒト由来の免疫グロブリンの重鎖（Heavy Chain, H鎖）の定常領域（Constant region）、Fc領域またはそれらの一部を意味する。該免疫グロブリンは、どのようなクラス及びサブクラスに属する免疫グロブリンであってもよく、具体的には、IgG（IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）、IgM、IgA（IgA1及びIgA2）、IgD及びIgEを挙げることができる。好ましくは、IgG（IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4）、またはIgMである。本発明における特に好ましい例としては、ヒト由来のIgG（IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4）に属する免疫グロブリンである。

免疫グロブリンは、2つの相同な軽鎖（Light Chain, L鎖）と2つの相同な重鎖（Heavy Chain, H鎖）の4つの鎖が、ジスルフィド結合（S-S結合）で結合したY字形の構造単位を有する。軽鎖は、軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）及び軽鎖定常領域（C<sub>L</sub>）から構成される。重鎖は、重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）と重鎖定常領域（C<sub>H</sub>）から構成される。

重鎖定常領域は、クラス（IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE）並びにサブクラス（I

## 16

gG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2) 毎に各々固有のアミノ酸配列を有するいくつかのドメインから構成される。

IgG (IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4) の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C_H1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C_H2$ ドメイン及び $C_H3$ ドメインから構成される。

同様にIgG1の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_11$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_12$ ドメイン及び $C\gamma_13$ ドメインから構成される。IgG2の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_21$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_22$ ドメイン及び $C\gamma_23$ ドメインから構成される。IgG3の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_31$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_32$ ドメイン及び $C\gamma_33$ ドメインから構成される。IgG4の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\gamma_41$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\gamma_42$ ドメイン及び $C\gamma_43$ ドメインから構成される。

IgAの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha_1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_2$ ドメイン及び $C\alpha_3$ ドメインから構成される。

同様にIgA1の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha_11$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_12$ ドメイン及び $C\alpha_13$ ドメインから構成される。IgA2の重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\alpha_21$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\alpha_22$ ドメイン及び $C\alpha_23$ ドメインから構成される。

IgDの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\delta_1$ ドメイン、ヒンジ領域、 $C\delta_2$ ドメイン及び $C\delta_3$ ドメインから構成される。

IgMの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\mu_1$ ドメイン、 $C\mu_2$ ドメイン、 $C\mu_3$ ドメイン及び $C\mu_4$ ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。

IgEの重鎖は、N末端から順に、 $V_H$ 、 $C\epsilon_1$ ドメイン、 $C\epsilon_2$ ドメイン、 $C\epsilon_3$ ドメイン及び $C\epsilon_4$ ドメインから構成され、IgG、IgA及びIgDに見られるようなヒンジ領域を有しない。

さらに、IgGを例に挙げるならば、IgGをパパインで処理すると、2つの重鎖を

連結させているヒンジ領域中に存在するジスルフィド結合のややN末端側で切断されて、 $V_H$ 及び $C_H1$ からなる重鎖断片と1つの軽鎖がジスルフィド結合で連結した2つの相同なFab、並びにヒンジ領域、 $C_H2$ ドメイン及び $C_H3$ ドメインからなる2つの相同な重鎖断片がジスルフィド結合で連結した1つのFcを生ずる（以上、「免疫学イラストレイテッド」、原書第2版、第65～75頁、1992年、南江堂発行、及び「最新医科学の焦点「免疫系の認識機構」」、第4～7頁、1991年、南江堂発行など参照）。

即ち、上述の「免疫グロブリンの重鎖の定常領域の一部」とは、上述のような構造的特徴を有する免疫グロブリンの重鎖の定常領域一部を意味し、好ましくは、 $C1$ ドメインを欠く定常領域またはFc領域である。具体的には、IgG、IgAまたはIgDの場合には、各々のヒンジ領域、 $C2$ ドメイン及び $C3$ ドメインからなる領域が挙げられ、IgMまたはIgEの場合には、各々の $C2$ ドメイン、 $C3$ ドメイン及び $C4$ ドメインからなる領域が挙げられる。とりわけ好ましい例としては、ヒト由来のIgG1のFc領域を挙げることができる。

上述の融合ポリペプチドは、前述のようなIgG等の免疫グロブリンの定常領域の一部（例えば、Fc）を融合パートナーとして有することから、該免疫グロブリン断片に特異的に結合するというプロテインAの性質を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることにより該融合ポリペプチドを極めて容易に精製することが可能であるという点で利点を有する。さらに、種々の免疫グロブリンのFcに対する種々の抗体が提供されていることから、該Fcに対する抗体を用いて、該融合ポリペプチドのイムノアッセイを簡便に行うことができる。

前記「物質」の定義に包含される「ポリペプチド」には、また「AILIMに結合するポリペプチド」が包含される。

「AILIMに結合するポリペプチド」としては、具体的には、AILIMと相互作用するリガンドである既知のB7h、B7RP-1、GL50あるいはLICOSと称される分子（Nature, Vol.402, No.6763, p.827-832, 1999; Nature Medicine, Vol.5, No.12, p.

1365-1369, 1999; J. Immunology, Vol.164, p.1653-1657, 2000; Curr. Biol., Vol.10, No.6, p.333-336, 2000) を構成するポリペプチドの全部または一部を含むポリペプチドが挙げられる。

好ましくは、上記リガンド (B7h、B7RP-1、GL50、LICOS) の細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド、または該ポリペプチドと免疫グロブリン (好ましくはヒト免疫グロブリン) の重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチドである。ここで、「細胞外領域」及び「免疫グロブリンの重鎖の定常領域」なる用語については、上述と同様の意味を有する。

上述したポリペプチド、該ポリペプチドの一部 (断片) 及び融合ポリペプチドは、後述するような遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術的分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

本発明における「抗体」とは、前記で定義した哺乳動物のAILIM (特に好ましくはヒトAILIM) に対するポリクローナル抗体 (抗血清) あるいはモノクローナル抗体を意味し、好ましくはモノクローナル抗体である。

具体的には、AILIMに結合しAILIM発現細胞の増殖を抑制するか、またはAILIMに結合しAILIM発現細胞によるインターフェロン $\gamma$ 若しくはインターロイキン4の産生を抑制する活性を有する抗体である。

本発明の「抗体」は、本発明のAILIMを発現する細胞 (天然の細胞、株化細胞、腫瘍細胞など)、AILIMをその細胞表面に高発現するように遺伝子組換え技術を用いて作製された形質転換体、AILIMを構成するポリペプチド、該AILIMポリペプチド、またはAILIMの細胞外領域を含む前述の融合ポリペプチドを抗原として用い、該抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体及びヒト型抗体 (CDR-grafted抗体)、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒト抗体も包含する。

モノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有するモノクローナル抗体もが包含される。好ましくは、IgGまたはIgMである。

ポリクローナル抗体（抗血清）あるいはモノクローナル抗体は、既存の一般的な製造方法によって製造することができる。即ち、例えば、前述のような抗原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、哺乳動物、好ましくは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ヤギ、ウマあるいはウシ、より好ましくはマウス、ラット、ハムスター、モルモットまたはウサギに免疫する。

ポリクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た血清から取得することができる。またモノクローナル抗体は、該免疫感作動物から得た該抗体産生細胞と自己抗体産生能のない骨髓腫系細胞（ミエローマ細胞）からハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマをクローン化し、哺乳動物の免疫に用いた抗原に対して特異的親和性を示すモノクローナル抗体を産生するクローンを選択することによって製造される。

モノクローナル抗体は、具体的には下記のようにして製造することができる。即ち、前述のような抗原を免疫原とし、該免疫原を、必要に応じてフロイントアジュバント（Freund's Adjuvant）とともに、非ヒト哺乳動物、具体的には、マウス、ラット、ハムスター、モルモットあるいはウサギ、好ましくはマウス、ラットあるいはハムスター（後述するヒト抗体産生トランスジェニックマウスのような他の動物由来の抗体を産生するように作出されたトランスジェニック動物を含む）の皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内あるいは腹腔内に1乃至数回注射するかあるいは移植することにより免疫感作を施す。通常、初回免疫から約1乃至14日毎に1乃至4回免疫を行って、最終免疫より約1乃至5日後に免疫感作された該哺乳動物から抗体産生細胞が取得される。免疫を施す回数及び時間的インターバルは、使用する免疫原の性質などにより、適宜変更することがで

きる。

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法（ネイチャー(Nature)、第256巻、第495～第497頁、1975年）及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができる。即ち、前述の如く免疫感作された非ヒト哺乳動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒト由来の自己抗体産生能のないミエローマ細胞との細胞融合させることにより調製される。

細胞融合に用いられるミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8.653 (653)、P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1)、P3/X63-Ag8.U1 (P3U1)、SP2/0-Ag14 (Sp2/0、Sp2)、PAI、F0、NS0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15を使用することができる。

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた免疫抗原に対する反応性を、例えばRIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行なうことができる。

ハイブリドーマからのモノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマをインビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行い、得られた培養上清、または哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。

インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、

培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

基本培地としては、例えば、Ham' F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び／または種々無機あるいは有機物質等を含有することができる。

モノクローナル抗体の単離、精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈澱法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAEまたはDE52等）、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。

「組換えキメラモノクローナル抗体」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その可変領域が、非ヒト哺乳動物（マウス、ラット、ハムスターなど）のイムノグロブリン由来の可変領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするマウス／ヒトキメラモノクローナル抗体等のキメラモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG（IgG1, IgG2, IgG3, IgG4）、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、組換えキメラモノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。

組換えキメラモノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

## 22

例えば、マウス／ヒトキメラモノクローナル抗体は、実験医学（臨時増刊号）、第1.6巻、第10号、1988年及び特公平3-73280号公報等を参照しながら作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから単離した該マウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>H</sub>遺伝子（H鎖可変領域をコードする再配列されたVDJ遺伝子）の下流に、ヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したCH遺伝子（H鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、また該ハイブリドーマから単離したマウスモノクローナル抗体をコードするDNAから取得した活性なV<sub>L</sub>遺伝子（L鎖可変領域をコードする再配列されたVJ遺伝子）の下流にヒトイムノグロムリンをコードするDNAから取得したC<sub>L</sub>遺伝子（L鎖定常領域をコードするC遺伝子）を、各々発現可能なように配列して1つ又は別々の発現ベクターに挿入し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞を培養することにより作製することができる。

具体的には、まず、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法によりDNAを抽出後、該DNAを適切な制限酵素（例えばEcoRI、Hind III等）を用いて消化し、電気泳動に付して（例えば0.7%アガロースゲル使用）サザンブロット法を行う。泳動したゲルを例えばエチジウムブロマイド等で染色し、写真撮影後、マーカの位置を付し、ゲルを2回水洗し、0.25MのHCl溶液に15分間浸す。次いで、0.4NのNaOH溶液に10分間浸し、その間緩やかに振盪する。常法により、フィルターに移し、4時間後フィルターを回収して2×SSCで2回洗浄する。フィルターを十分乾燥した後、ベイクング（75℃、3時間）を行う。ベイクング終了後に、該フィルターを0.1×SSC/0.1%SDS溶液に入れ、65℃で30分間処理する。次いで、3×SSC/0.1%SDS溶液に浸す。得られたフィルターをプレハイブリダイゼーション液と共にビニール袋に入れ、65℃で3～4時間処理する。

次に、この中に<sup>32</sup>P標識したプローブDNA及びハイブリダイゼーション液



## 23

を入れ、65℃で12時間程度反応させる。ハイブリダイゼーション終了後、適切な塩濃度、反応温度および時間（例えば、2×SSC/0.1%SDS溶液、室温、10分間）のもとで、フィルターを洗う。該フィルターをビニール袋に入れ、2×SSCを少量加え、密封し、オートラジオグラフィーを行う。

上記サザンプロット法により、マウスモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖を各々コードする再配列されたVDJ遺伝子及びVJ遺伝子を同定する。同定したDNA断片を含む領域をシヨ糖密度勾配遠心にて分画し、ファージベクター（例えば、Charon 4A、Charon 28、λEMBL3、λEMBL4等）に組み込み、該ファージベクターで大腸菌（例えば、LE392、NM539等）を形質転換し、ゲノムライブラリーを作製する。そのゲノムライブラリーを適当なプローブ（H鎖J遺伝子、L鎖（κ）J遺伝子等）を用いて、例えばベントンデイス法（Science、第196巻、第180～第182頁、1977年）に従って、ブランクハイブリダイゼーションを行い、再配列されたVDJ遺伝子あるいはVJ遺伝子を各々含むポジティブクローンを得る。得られたクローンの制限酵素地図を作製し、塩基配列を決定し、目的とする再配列されたV<sub>H</sub>(VDJ)遺伝子あるいはV<sub>L</sub>(VJ)遺伝子を含む遺伝子が得られていることを確認する。

一方、キメラ化に用いるヒトC<sub>H</sub>遺伝子及びヒトC<sub>L</sub>遺伝子を別に単離する。例えば、ヒトIgG1とのキメラ抗体を作製する場合には、C<sub>H</sub>遺伝子であるC<sub>H</sub>1遺伝子とC<sub>L</sub>遺伝子であるC<sub>κ</sub>遺伝子を単離する。これらの遺伝子はマウス免疫グロブリン遺伝子とヒト免疫グロブリン遺伝子の塩基配列の高い相同性を利用してヒトC<sub>H</sub>1遺伝子及びヒトC<sub>κ</sub>遺伝子に相当するマウスC<sub>H</sub>1遺伝子及びマウスC<sub>κ</sub>遺伝子をプローブとして用い、ヒトゲノムライブラリーから単離することによって得ることができる。

具体的には、例えば、クローンIg146（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第75巻、第4709～第4713頁、1978年）からの3kbのHind III-BamHI断片とクローンMEP 10（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第78巻、第474～第478頁、1981年）からの6.

## 24

8kbのEcoRI断片をプローブとして用い、ヒトのラムダCharon 4A のHae III-Alu Iゲノムライブラリー (Cell、第15巻、第1157～第1174頁、1978年) 中から、ヒトC<sub>H</sub>遺伝子を含み、エンハンサー領域を保持しているDNA断片を単離する。また、ヒトC<sub>H</sub>1遺伝子は、例えばヒト胎児肝細胞DNAをHind IIIで切断し、アガロースゲル電気泳動 で分画した後、5.9kbのバンドをλ788に挿入し、前記のプローブを用いて単離する。

このようにして単離されたマウスV<sub>H</sub>遺伝子とマウスV<sub>L</sub>遺伝子、及びヒトC<sub>H</sub>遺伝子とヒトC<sub>L</sub>遺伝子を用いて、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮しながらマウスV<sub>H</sub>遺伝子の下流にヒトC<sub>H</sub>遺伝子を、またマウスV<sub>L</sub>遺伝子の下流にヒトC<sub>L</sub>遺伝子を、適切な制限酵素及びDNAリガーゼを用いて、例えばpSV2gptあるいはpSV2neo等の発現ベクターに常法に従って組み込む。この際、マウスV<sub>H</sub>遺伝子／ヒトC<sub>H</sub>遺伝子とマウスV<sub>L</sub>遺伝子／ヒトC<sub>L</sub>遺伝子のキメラ遺伝子は、一つの発現ベクターに同時に配置されてもよいし、各々別個の発現ベクターに配置することもできる。

このようにして作製したキメラ遺伝子挿入発現ベクターを、例えばP3X63・Ag8・653細胞あるいは SP210細胞といった、自らは抗体を産生していない骨髓腫細胞にプロトプラスト融合法、DEAEーデキストラン法、リン酸カルシウム法あるいは電気穿孔法等により導入する。形質転換細胞は、発現ベクターに導入された薬物耐性遺伝子に対応する薬物含有培地中での培養により選別し、目的とするキメラモノクローナル抗体産生細胞を取得する。

このようにして選別された抗体産生細胞の培養上清中から目的のキメラモノクローナル抗体を取得する。

「ヒト型モノクローナル抗体 (CDR-grafted抗体)」は、遺伝子工学的に作製されるモノクローナル抗体であって、具体的には、その超可変領域の相補性決定領域の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスターなど) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の相補性決定領域であり、その可変領

域の枠組領域がヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒトイムノグロブリン由来の定常領域であることを特徴とするヒト型モノクローナル抗体を意味する。

ここで、超可変領域の相補性決定領域とは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する部位である3つの領域 (Complementarity-determining residue ; CDR1、CDR2、CDR3) を指し、また可変領域の枠組領域とは、該3つ相補性決定領域の前後に介在する比較的保存された4つの領域 (Framework region ; FR1、FR2、FR3、FR4) を指す。

換言すれば、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の相補性決定領域の一部または全部以外の全ての領域が、ヒトイムノグロブリンの対応領域と置き代わったモノクローナル抗体を意味する。

ヒトイムノグロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) 、IgM、IgA、IgD及びIgE等のアイソタイプにより各々固有のアミノ酸配列を有するが、本発明においては、該ヒト型モノクローナル抗体の定常領域はいずれのアイソタイプに属するヒトイムノグロブリンの定常領域であってもよい。好ましくは、ヒトIgGの定常領域である。また、ヒトイムノグロブリン由来の可変領域の枠組領域についても限定されるものではない。

ヒト型モノクローナル抗体は、例えば以下のようにして製造することができる。しかしながら、そのような製造方法に限定されるものでないことは言うまでもない。

例えば、マウスモノクローナル抗体に由来する組換えヒト型モノクローナル抗体は、特表平4-506458号公報及び特開昭62-296890号公報等を参照して、遺伝子工学的に作製することができる。即ち、マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから、少なくとも1つのマウスH鎖CDR遺伝子と該マウスH鎖CDR遺伝子に対応する少なくとも1つのマウスL鎖CDR遺伝子を単離し、またヒトイムノグロブリン遺伝子から前記マウスH鎖CDRに対応するヒトH鎖CDR以外の全領域を

コードするヒトH鎖遺伝子と、前マウスL鎖CDRに対応するヒトL鎖CDR以外の全領域をコードするヒトL鎖遺伝子を単離する。

単離した該マウスH鎖CDR遺伝子と該ヒトH鎖遺伝子を発現可能なように適当な発現ベクターに導入し、同様に該マウスL鎖CDR遺伝子と該ヒトL鎖遺伝子を発現可能なように適当なもう1つの発現ベクターに導入する。または、該マウスH鎖CDR遺伝子／ヒトH鎖遺伝子とマウスL鎖CDR遺伝子／ヒトL鎖遺伝子を同一の発現ベクターに発現可能なように導入することもできる。このようにして作製された発現ベクターで宿主細胞を形質転換することによりヒト型モノクローナル抗体産生形質転換細胞を得、該形質転換細胞を培養することにより培養上清中から目的のヒト型モノクローナル抗体を得る。

「ヒトモノクローナル抗体」とは、イムノグロブリンを構成するH鎖の可変領域及びH鎖の定常領域並びにL鎖の可変領域及びL鎖の定常領域を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。

ヒト抗体（好ましくはヒトモノクローナル抗体）は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。

例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; 特表平4-504365号公報; 特表平7-509137号公報; 日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年; 国際出願公開W094/25585号公報; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; 及び特表平6-500233号公報などに記載の方法に従って作製することができる。

また、昨今開発された技術であるトランスジェニックなウシやブタのミルク中

からヒト由来タンパクを製造する方法を適用することも可能である（日系サイエンス、1997年4月号、第78頁乃至84頁）。

本発明における「抗体の一部」とは、前述のようなモノクローナル抗体の一部の領域を意味し、具体的には $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$  (variable fragment of antibody)、 $sFv$ 、 $dsFv$  (disulphide stabilised  $Fv$ ) あるいは $dAb$  (single domain antibody) などを意味する (Exp. Opin. Ther. Patents, 第6巻, 第5号, 第441~456頁, 1996年)。

ここで、「 $F(ab')_2$ 」及び「 $Fab'$ 」とは、イムノグロブリン (モノクローナル抗体) を、蛋白分解酵素であるペプシンあるいはババイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをババインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されて $V_L$  (L鎖可変領域) と $C_L$  (L鎖定常領域) からなるL鎖、及び $V_H$  (H鎖可変領域) と $C_H\gamma 1$  (H鎖定常領域中の $\gamma 1$ 領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々 $Fab'$ という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つの $Fab'$ がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントを $F(ab')_2$ という。

本発明における「移植片拒絶反応 (graft rejection)」とは、移植片 (移植される生体の一部であり、細胞、組織または臓器) のドナーのレシピエントの遺伝的背景が異なる場合 (即ち、同種移植または異種移植)、移植片がレシピエントによって異物と認識されることによりレシピエントの免疫系がその移植片を拒絶し排除しようとする様々な免疫反応である。この移植に伴うこの免疫反応は、  
(1) 移植直後に起こる強い拒絶反応である超急性拒絶反応 (hyper-acute rejec

tion reaction)、(2) 移植後数ヶ月以内に見られる急性拒絶反応 (acute rejection reaction)、(3) 移植後数ヶ月以降に見られる慢性拒絶反応 (chronic rejection reaction) に分けられる。また、T細胞に代表される免疫担当細胞による細胞性免疫と抗体による液性免疫が複雑に連携した形で起こるが、主としては細胞性免疫である。

この移植片拒絶反応により、移植片は最終的には壊死脱落する。また、レシビエントには、発熱、白血球増多、倦怠感などの重篤な全身症状だけでなく、移植局所の腫脹や圧痛が起こる。さらには、感染症などの重篤な合併症を引き起こすこととなる。

とりわけ、ブタなどの異種の移植片をヒトに移植する場合には、超急性拒絶反応が起こり、移植片が分単位で拒絶されてしまうという大きな問題が存在する。

本発明における「移植片」とは、ドナー哺乳動物からレシビエント哺乳動物に移植される「臓器またはその一部」または「組織」を意味する。

本発明における当該移植に係る「臓器またはその一部」とは、哺乳動物（好ましくはヒトまたはブタであり、特に好ましくはヒトである。）の生体を構成する任意の臓器またはその一部を意味する。好ましくは、肝臓、心臓、肺、脾臓、腎臓、大腸若しくは小腸、またはその一部を挙げることができる。特に好ましくは、肝臓またはその一部である。

本発明における移植に係る「組織」とは、哺乳動物（好ましくはヒトまたはブタであり、特に好ましくはヒトである。）の生体に由来する任意の組織を意味する。好ましくは、皮膚、角膜若しくは骨などの組織、または心臓弁などが挙げられるがこの限りではない。

本発明における「免疫抑制剤」とは、臨床現場において行われている細胞、組織あるいは臓器の移植において、移植片の移植により惹起されるレシビエントにおける免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）を抑制するために用いられている政府機関から医薬品としての製造販売承認された既存の1または複数の任意の免疫抑制

剤、または現在臨床試験若しくは前臨床試験中であるかまたは将来臨床試験において使用され、当該試験の後に将来政府機関から医薬品としての製造販売承認がされるであろう1または複数の任意の免疫抑制剤を意味する。

それらの免疫抑制剤は、単独で用いられるだけでなく、2剤、3剤またはそれ以上を併用して用いられている。従って、本発明に係る「免疫抑制剤」とは、1種の薬剤の使用、または複数の薬剤の併用（好ましくは2剤若しくは3剤の併用）も含む。

当該免疫抑制剤としては、好ましくは、サイクロスポリン (cyclosporin; CsA) ; タクロリムス (tacrolimus; FK-506) ; アザチオプリン (azathioprine ; AZ) ; ミコフェノール酸モフェチル (mycophenolate mofetil; MMF) ; ミゾリビン (mizoribine; MZ) ; レフルノマイド (leflunomide; LEF) ; プレドニゾロン (prednisolon) やメチルプレドニゾロン (methylprednisolon) などの副腎皮質ステロイド（別称：副腎皮質ホルモン；コルチコステロイド (corticosteroid) ; コルチコイド (corticoid)） ; シロリムス (sirolimus)（別称：ラパマイシン (rapamycin)） ; デオキシスパーガリン (deoxyspergualin; DSG) ; FTY720（化学名称：2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]-1,3-propanediol hydrochloride）及び後述する「CTLA4医薬」から選ばれる1または複数の薬剤を挙げることができる。特に好ましくはタクロリムス (FK-506) 及びサイクロスポリンのいずれかまたは両方である。

本発明における「CTLA4医薬」とは、(1) ヒトのCTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4; 〈アミノ酸配列〉 GenBank Accession No.NP 005205 ; 〈cDNA〉 GenBank Accession No.NM 005214) の全長（実質的に同一なアミノ酸配列を有する分子を含む。）または細胞外領域の全部若しくはその一部からなるポリペプチド、(2) ヒトCTLA4の細胞外領域の全部若しくは一部と他の蛋白質の全部若しくは一部（特に好ましくは、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域の全部または一部）とからなる融合ポリペプチド（以下、CTLA4-IgFcまたはCTLA4-

Igと省略する。)、または(3)前記(1)のポリペプチドまたは前記(2)の融合ポリペプチドを哺乳動物(特に好ましくはヒト)の体内に供給し得るDNAまたは該DNAからなるベクター(特に好ましくは遺伝子治療で汎用されるプラスミドあるいはウイルス(レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなど)に由来するウイルスベクターなど)を活性成分として含む医薬を意味する。

ここで「細胞外領域」、「一部」、「免疫グロブリン重鎖の定常領域」、「融合ポリペプチド」、「実質的に同一」等の各用語は、前述の定義と同様の意味を有する。

前述のCTLA4-Igの有意な免疫抑制効果については多数の報告があり、例えば、Bristol-Myers Squibb社/Repligen社の開発品であるY100F(100番目のチロシンがアラニンに変換されている)の高い免疫抑制効果が種々の動物試験で確認されており、この製品も本発明におけるCTLA4医薬の一つとして包含される(医学のあゆみ, Vol.194, No.14, p.1195-1200, 2000; J. Clin. Invest., Vol.103, p.1223-1225, 1999; N. Engl. J. Med., Vol.335, p.1369-1377, 1996; J. Exp. Med., Vol.178, p.1801-1806, 1993; Blood, Vol.94, p.2523-2529, 1999; Nature Med., Vol.6, p.464-469, 2000; Blood, Vol.83, p.3815-3823, 1995; J. Clin. Invest., Vol.2, p.473-482, 1998; Blood, Vol.85, p.2607-2612, 1995; N. Engl. J. Med., Vol.340, p.1704-1714, 1999; N. Engl. J. Med., Vol.335, p.1369-1377, 1996; J. Clin. Invest., Vol.103, p.1243-1252, 1999)。

本発明において「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、増量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、注射剤、液剤、カプセル剤、トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。

これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経



## 31

口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベッサリーなどが含まれる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分（前記の本発明に係る「物質」など）の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から $100\text{mg}$ （あるいは $10\mu\text{g}$ から $500\text{mg}$ ）の範囲で投与することができる。しかしながら、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。

とりわけ注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の非毒性の薬学的に許容され得る担体中に $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ $\text{ml}$ 担体 $\sim 10\text{mg}$ 抗体/ $\text{ml}$ 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において $1\text{kg}$ 体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}\sim 50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回 $\sim$ 数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射のような医療上適当な投与形態が例示できる。好ましくは静脈内注射である。

また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。

そのような注射剤の無菌化は、バクテリア保留フィルターを通す濾過滅菌、殺菌剤の配合または照射により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

本発明の医薬組成物は、重篤な循環器系疾患に罹患しているレシビエントの、

ドナーの臓器（肝臓、心臓、肺、腎臓、膵臓など）若しくはその一部または組織（皮膚、角膜、骨などの組織）の移植（同種移植または異種移植）による治療における深刻な問題である免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）を抑制、予防及び／または治療のために極めて有用である。

本発明の医薬組成物はまた、そのような移植治療での移植片拒絶反応の抑制のために施されている既存の免疫抑制剤による移植片拒絶反応の抑制において併用することにより、移植片拒絶反応（免疫拒絶反応）の抑制の効果を増大させることが可能である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、移植したドナーの肝臓のレシピエント内での生着日数の延長を指標とする、臓器移植に伴い起こる免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）の抗AILIM抗体及び／または免疫抑制剤による抑制効果を示す図である。

図2は、移植したドナーの肝臓のレシピエント内での生着日数の延長を指標とする、臓器移植に伴い起こる免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）の抗AILIM抗体及び／または免疫抑制剤による抑制効果を示す図である。

図3は、移植したドナーの心臓のレシピエント内での生着日数の延長を指標とする、臓器移植に伴い起こる免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）の抗AILIM抗体（抗ICOS抗体と別称）による抑制効果を示す図である。

図4は、移植したドナーの心臓のレシピエント内での生着日数の延長を指標とする、臓器移植に伴い起こる免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）のAILIM-Ig（ICOS-Igと別称）による抑制効果を示す図である。

図5は、移植したドナーの心臓へ浸潤したAILIM発現細胞の程度を示す写真である。

図6は、移植したドナーの心臓のレシピエント内での生着日数の延長を指標とする、臓器移植に伴い起こる免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）の抗AILIM抗体及

び／またはAdCTLA4-Igによる抑制効果を示す図である。

図7は、移植したドナーの心臓（一次心移植及び二次心移植）及び皮膚（一次皮膚移植）のレシビエント内での生着の有無を指標とする、臓器移植に伴い起こる免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）の抗AILIM抗体とAdCTLA4-Igとの併用による抑制効果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を以て本発明をさらに詳細に説明するが、本発明が該実施例に記載される態様のみに限定されるものではないことは言うまでもない。

実施例1 肝臓移植での移植片拒絶反応のAILIM制御物質による抑制効果

##### <1>試薬及び試験方法

##### <1-1> 動物

成体Lewisラット（雄、210-250g）及びDAラット（雄、210-250g）を、各々レシビエント及びドナーとして用いた。

##### <1-2> 抗ラットAILIMモノクローナル抗体

既報のマウス抗ラットAILIMモノクローナル抗体（マウス抗ラットJTT-1抗原モノクローナル抗体）を産生する「JTT-1」と命名したハイブリドーマ（当該ハイブリドーマは1996年10月11日付でブダベスト条約の下で認定された国際寄託機関である日本国通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託されている。国際寄番号：FERM BP-5707）をin vitroまたはin vivoで培養して得られる培養上清または腹水から精製したモノクローナル抗体を用いた（日本国特許出願公開11-29599号公報（実施例1及び2）、及び国際特許出願公開W098/38216号（実施例1及び2））。以下、この抗体を単に抗AILIM抗体と呼ぶ。

##### <1-3> 肝臓の移植

既報の鎌田らの方法に従って、ドナーとしてのDAラットの肝臓をレシビエントとしてのLewisラットに移植した（Surgery, 93, p.64, 1983; Transplantation,

30, p.43, 1980; Transplantation, 28, p.47, 1979)。

即ち、DAラットから採取した肝臓を門脈血管 (portal vein) から氷冷滅菌蒸留水を流すことにより洗浄した。次いで、肝上の大静脈 (supra-hepatic vena cava) を縫合することにより、当該肝臓のレシピエントであるLewisラットへの移植を開始した。その後に、カフ (cuff) 技術を用いて、門脈血管 (portal vein) と肝臓下の大静脈 (infra-hepatic vena cava) を縫合した (Transplant. Proc., 19, p.1158, 1987; Transplantation, 43, p.745, 1987)。

レシピエントであるラットが、移植の完了後3日以内に死んだ場合を移植の技術的な失敗と判断した。その結果、移植の成功率は95%であった。

#### <1-4> 抗AILIM抗体及び／または免疫抑制剤の投与

移植完了後のLewisラット (各群5-9匹) の各々に、抗AILIM抗体及び／または免疫抑制剤FK-506を下記の用量及びタイミングで投与した。なお、移植完了直後をゼロ (0) 日目とした。

なお、抗AILIM抗体及び免疫抑制剤FK-506のいずれをも投与しない群を対照とした。

1. 抗AILIM抗体 (1mg/kg; 静注; 0日目)
2. 抗AILIM抗体 (1mg/kg; 静注; 0及び6日目)
3. 抗AILIM抗体 (1mg/kg; 静注; 0、3及び6日目)
4. 抗AILIM抗体 (1mg/kg; 静注; 0、3、6、9及び12日目)
5. 抗AILIM抗体 (0.3mg/kg; 静注; 0、3、6、9及び12日目)
6. FK-506 (1mg/kg; 筋注; 0日目)
7. 抗AILIM抗体 (1mg/kg; 静注; 0日目) とFK-506 (1mg/kg; 筋注; 0日目)

移植肝の生存日数 (移植肝のレシピエント内での生着の日数) を、Kaplan-Meierテストに従って評価して求めた。

#### <2> 結果

## 35

結果を図1及び図2に示す。図2のデータの一部は、図1に示すデータを更新したものである。

この結果、対照に比べ、抗AILIM抗体(1mg/kg)を、移植後経時的に3回または5回投与した群において、移植肝の生存日数(移植肝の生着日数)の有意な改善が見られた。

また、さらに低用量の抗AILIM抗体(0.3mg/kg)を、移植後経時的に5回投与した群においても同様に生存日数(移植肝の生着日数)の有意な延長が観察された。

さらに、驚くべきことに、臨床現場において汎用されている免疫抑制剤であるFK-506と抗AILIM抗体を併用した場合には、抗AILIM抗体の投与が1回であるにも関わらず、移植肝の生存日数(移植肝の生着日数)は大幅に延長され、FK-506(1mg/kg)を単独で1回投与した場合の生存日数(移植肝の生着日数)をはるかに上回るものであった。

この結果から、下記が明らかになった。

1) 抗AILIM抗体は、臓器等の移植片の移植に伴い起こる移植片拒絶反応(免疫拒絶反応)を有意に抑制する。

2) 抗AILIM抗体と免疫抑制剤を併用することにより、いずれか一方を用いた場合よりも、臓器等の移植片の移植に伴い起こる移植片拒絶反応をさらに強く抑制することができる。

## 実施例2 心臓移植での免疫拒絶反応のAILIM制御物質による抑制効果(その1)

### <1>試薬、動物及び試験方法

#### <1-1> 動物

成体C3H/Heマウス(雄、6週齢)及びBALB/cマウス(雄、6週齢)を、各々レシピエント及びドナーとして用いた。

## 36

## &lt;1-2&gt; 抗マウスAILIMモノクローナル抗体の調製

以下のようにして調製した。

既報のマウスAILIM (Int. Immunol., Vol.12, No.1, p.51-55, 2000) の全長アミノ酸配列をコードするcDNAを用いて、遺伝子組換え技術を用いて常法に従ってマウスAILIMを発現する形質転換細胞を調製した。

該形質転換細胞をホモジナイズし、超遠心分離 ( $100,000 \times g$ ) して、細胞膜画分を含む遠心残さを回収し、PBSに懸濁させた。得られた細胞膜画分を、完全フロインドアジュバントとともにWistarラットのフットパッド内に注射することにより初回免疫 (0日) した。さらに該細胞膜画分抗原を7日目、14日目および28日目という間隔でフットパッド内に投与した。最後の免疫から2日後にリンパ節細胞を採取した。

該リンパ節細胞とマウスミエローマ細胞PAI (JCR No.B0113; Res. Disclosure, Vol.217, p.155, 1982) とを5:1で混合し、融合剤としてポリエチレングリコール4000 (Boehringer Mannheim製) を用いて細胞融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの選択は、10% ウシ胎児血清とアミノプテリンを含有するHAT含有ASF104培地 (味の素製) 中で培養することにより行った。

各々のハイブリドーマの培養上清中に生成されたモノクローナル抗体のマウスAILIMに対する反応性を、各々の培養上清を、前記組換えマウスAILIM発現形質転換細胞に反応させた後、FITC標識抗ラットIgG (Cappel製) と反応させることにより染色された細胞の蛍光強度をEPICS-ELITEフローサトメーターで測定することにより確認した。この結果、マウスAILIMに反応性を有するモノクローナル抗体を産生する複数のハイブリドーマを得た。

それらのハイブリドーマの内の1つを「B10.5」と命名した。このハイブリドーマ (各々 $10^6$ 乃至 $10^7$ 個/0.5ml/マウス) を、ICR nu/nuマウス (雌、7乃至8週齢) の腹腔内に注射した。10乃至20日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法

## 37

に従って採取した腹水からラット抗マウスAILIMモノクローナル抗体 (IgG2a)を大量調製した。以下、この抗体を単に抗AILIM抗体と呼ぶ。

## &lt;1-3&gt; 心臓の移植

既報の方法に従って、ドナーとしてのBALB/cマウスの心臓をレシピエントとしてのC3H/Heマウスの腹部に移植した。なお、移植心の拍動の消失を以って移植拒絶の完結と判断した。

## &lt;2&gt; 試験1 (抗AILIM抗体の投与による)

移植完了後のC3H/Heマウス (10匹) の各々に、抗AILIM抗体 (10mg/kg) を移植直後 (0日; 200 $\mu$ g)、2日目 (200 $\mu$ g)、4日目 (200 $\mu$ g)、7日目 (200 $\mu$ g) 及び10日目 (100 $\mu$ g) に投与した。抗AILIM抗体を投与しない群 (25匹) を対照とした。

移植後の移植心の生存日数 (移植心のレシピエント内での生着の日数) を、Kaplan-Meierテストに従って評価して求めた。

移植心のレシピエント内での生着日数の平均値は、下記のとおりであった。

(抗AILIM抗体投与群)

生着日数: 9日が1匹、10日が3匹、13日が4匹、16日が2匹

(対照群)

生着日数: 6日が2匹、7日が9匹、8日が7匹、9日が3匹、10日が4匹

抗AILIM抗体を投与しない対照群では7.9日であったのに対し、抗AILIM抗体投与群では12.3日であり、抗AILIM抗体投与群では移植心の生着日数の有意な延長が確認された。

## &lt;3&gt; 試験2 (抗AILIM抗体またはAILIM-Igの投与による)

動物 (ドナー及びレシピエント) 及び抗AILIM抗体は前記と同一のものを用いた。一方、本試験で用いるAILIM-Igは、既報と同様にして調製したマウスAILIMの細胞外領域とIgG-Fcとの融合蛋白を用いた (国際出願公開公報W098/38216; 欧州特許出願公開EP0984023)。

また、心臓の移植は、試験1と同様にして行った。

移植完了後のC3H/Heマウスの各々に、抗AILIM抗体 ( $100\mu\text{g/day}$ ) またはAILIM-Ig ( $100\mu\text{g/day}$ ) を移植直後 (0日)、2日目、4日目、7日目及び10日目に腹腔内投与した。抗AILIM抗体及びAILIM-Igのいずれをも投与しない動物群を対照とした。

移植心のレシピエントマウス内での生着日数の平均値は、対照群では約7.7日であったのに対し、抗AILIM抗体投与群では約40.9日 (中間値: 29日/最長: 120日) であり、またAILIM-Ig投与群では30日以上 (中間値: 20日/最長: 64日) であった (図3及び図4)。即ち、抗AILIM抗体投与群及びAILIM-Ig投与群のいずれにおいても、移植心の生着期間の有意な延長が確認された。

また、常法に従ってHE染色 (hematoxylin/eosin-staining) により、AILIM (ICOS) 発現細胞の移植心への浸潤の程度を、対照マウス (心移植後の治療的処置なし) 及び移植後に抗AILIM抗体が投与されたマウスの各々について解析した。

その結果、無治療群では、AILIM (ICOS) 発現細胞の強い浸潤に加え、心筋の壊死が認められた (強染部分)。一方、抗AILIM抗体の投与を受けたマウスの移植心においては、心筋壊死は認められず、AILIM (ICOS) 発現細胞の浸潤の有意な減少が認められた (図5)。

### 実施例3 心臓及び皮膚の移植での免疫拒絶反応のAILIM制御物質による抑制効果

#### <1> 試薬、動物及び試験方法

##### <1-1> アデノウイルスベクター

発現コスミドカセットpAdex/CAhCTLA4-Ig (Transplantation, Vol.68, No.6, p.758, 1999) 及び親株であるアデノウイルスのゲノム (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.90, No.24, p.11498-11502, 1993) との間の相同組換えにより、hCTLA4-Ig (ヒトCTLA4の細胞外領域とヒトのFcとからなる融合蛋白) をコードす



るcDNAまたは大腸菌の $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子 (LacZ) の発現カセットを含む組換えアデノウイルスを作製した。

次いで、該組換えウイルスをヒト腎臓由来の293細胞株中で増殖させた。そうして調製されたウイルスベクターを回収し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。hCTLA4-IgのcDNAを含む組換えアデノウイルス及びLacZを含むアデノウイルスを各々、AdCTLA4-Ig及びAdLacZと命名した。

#### <1-2> 動物及び抗体

成体雄 (210-250g) のLewis (RT1<sup>l</sup>) ラットをレシピエントとして、また成体雄 (210-250g) のDA (RT1<sup>a</sup>) ラット若しくはBN (RT1<sup>n</sup>) ラットをドナーとして用いた。

実施例1で調製したマウス抗ラットAILIMモノクローナル抗体を用いた。

#### <1-3> 心臓及び皮膚の移植及び試験方法

既報の方法 (J. Thorac. Cardiovasc. Surg., Vol.57, No.2, p.225-229, 1969) に従い、DAラットから取得した心臓をLewisラットの腹腔に移植した。心移植の直後に、該レシピエントラットに、抗ラットAILIM抗体 (1mg/kg) 及び/またはAdCTLA4-Ig ( $10^9$  plaque-forming unit; pfu) を単回静脈内投与した。

抗ラットAILIM抗体及びAdCTLA4-Igのいずれをも投与しない移植動物群、及びそれらの代わりにAdLacZを投与した移植動物群を対照とした。各動物群の処置方法は下記のとおり。

グループ1 : 同種移植 (Lewis/DA) で、免疫抑制処置なし。

グループ2 : 同系移植 (Lewis/Lewis) で、免疫抑制処置なし。

グループ3 : 同種移植 (Lewis/DA) で、AdLacZを投与。

グループ4 : 同種移植 (Lewis/DA) で、AdCTLA4-Igを投与。

グループ5 : 同種移植 (Lewis/DA) で、抗AILIM抗体を投与。

グループ6 : 同種移植 (Lewis/DA) で、AdCTLA4-Ig及び抗AILIM抗体を投与。

なお、移植拒絶の完結は、移植心の拍動の消失を以って判断した。該移植拒絶は、常法に従ってHE染色 (hematoxylin/eosin-staining) により、移植心組織に浸潤した単核細胞及び筋細胞壊死を組織学的に解析した確認した。

次に、移植心が長期に亘り生着したグループ4及びグループ6のレシビエントラットの側胸壁に、心移植から140日目に、DAドナーラットの十分な厚さの皮膚片を移植した。該皮膚移植後においては、抗AILIM抗体やAdCTLA4-Ig等による免疫抑制処置は施さなかった。該皮膚片の生着期間の最終は、該移植皮膚片の黙視可能な程度が当初の10%以下に減少した時をその時とした。

次に、ドナー型皮膚の移植を受け移植拒絶反応を呈したグループ6のレシビエントの3匹の頸部に、DAラットの心臓の最初の移植から200日目に、カフ (cuff) 技術 (Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [A], Vol.79, No.4, p.366-372, 1971) を用いてドナーDAラットの心臓を再度移植した。

さらに、移植心が長期に亘り生着したグループ6のレシビエントラットの残りに、最初のDAドナーラットの心臓の移植から150日目に、BNドナーラットの心臓を移植した。

移植片のレシビエント内での生着の程度の統計的評価は、Kaplan-Meierのテストに従って行った。

## <2> 試験結果

図6に示すとおり、異種移植を施した未処置動物群 (グループ1) に比べ、Ad LacZを投与した動物群 (グループ3) 及び単一用量の抗AILIM抗体を投与した動物群 (グループ5) では、移植心のレシビエント内での生着の有意な延長は認められなかった。

一方、AdCTLA4-Igを投与した動物群 (グループ4) では、移植心 (最初に移植されたDAラットの心臓) の生着期間が有意に延長された (平均値: 約64日)。また、該グループ4 (10匹) の3匹では、100日以上という長期間の移植心の生着が認められた (図6)。

さらに、AdCTLA4-Igと抗AILIM抗体を併用した動物群（グループ6）においては、全てのレシピエントにおいて移植心（最初のDAラットの心臓）の生着が無期限に（300日以上）延長された（図6）。

グループ4の該レシピエントラットにおいては、該移植皮膚の拒絶に伴い移植心（最初に移植されたDAドナーラットの心臓）もまた拒絶されたのに対し、グループ6の該レシピエントラットでは該移植心の拒絶は見られなかった。

図7に示すとおり、グループ4及びグループ6においてドナーの皮膚移植を受けたレシピエントラットのいずれにおいても、該移植皮膚が拒絶されたものの、グループ4及び対照群における該移植皮膚の拒絶は皮膚移植から12日以内に完結したのに対し、グループ6においてはやや遅れ約16日以内であった。この結果は、AdCTLA4-Igを単独で用いる場合に比べ、AdCTLA4-Igとともに抗AILIM抗体を併用することで、移植皮膚の拒絶を遅らせることができることを示すものである。

また興味深いことに、グループ6において移植心（最初のDAラットの心臓）の長期の生着が認められたレシピエントラットでは、前述したとおり該移植皮膚は完全に拒絶されたものの、2度目の移植心（2度目に移植されたDAドナーラットの心臓）は無期限の生着が認められた。また、当該レシピエントラットにおいては、最初に移植されたドナー心臓が本試験の間中生着していた。

BNドナーラットの心臓の移植を受けたグループ6のレシピエントにおいては、最初に移植されたDAラットの心臓は本試験の間中拍動を続け生着していたが、2度目に移植された該BNドナーラットの心臓は、前記グループ1の動物群での結果と同様の時間内で拒絶された。

#### 産業上の利用の可能性

本発明の医薬組成物は、重篤な循環器系疾患に罹患しているレシピエントのドナーの臓器（肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓など）若しくはその一部または組織（皮膚、角膜、骨などの組織）を移植（同種移植または異種移植）による治療にお

ける深刻な問題である免疫拒絶反応（移植片拒絶反応）の抑制、予防及び／または治療において極めて有用である。

本発明の医薬組成物はまた、そのような移植治療での移植片拒絶反応（免疫拒絶反応）の抑制のために施されている既存の免疫抑制剤と併用することにより移植片拒絶反応をより強く抑制することが可能である。

また、本発明の医薬組成物に含まれるAILIMに対するヒト抗体を含んでなる医薬組成物は、マウス由来の抗体をヒトに投与する際のアレルギー等の副作用を全く惹起しないことから医薬品として極めて有用である。

## 請求の範囲

1. AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、臓器若しくはその一部または組織の移植に伴う移植片拒絶反応を抑制、治療または予防するための医薬組成物。
2. AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質及び薬学的に許容され得る担体を含んでなり、1または複数の免疫抑制剤による臓器若しくはその一部または組織の移植に伴う移植片拒絶反応の抑制、治療または予防の効果を増大するための医薬組成物。
3. 該免疫抑制剤が、アザチオプリン、副腎皮質ステロイド、サイクロスポリン、ミゾリビン及びタクロリムス (FK-506)、ミコフェノール酸モフェティル、レフルノマイド、シロリムス、デオキシスパーガリン、FTY720及びCTLA4医薬から選ばれる1または複数の薬剤であることを特徴とする請求項2に記載の医薬組成物。
4. 該移植が、同種移植であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の医薬組成物。
5. 該移植が、異種移植であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかに記載の医薬組成物。
6. 該臓器が、肝臓、心臓、腎臓、肺または脾臓であることを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の医薬組成物。
7. 該組織が、皮膚、角膜または骨の組織であることを特徴とする請求項1乃至請求項5のいずれかに記載の医薬組成物。
8. 該物質が、蛋白性物質であることを特徴とする請求項1乃至請求項7のいずれかに記載の医薬組成物。
9. 該蛋白性物質が、下記群から選ばれるいずれかであることを特徴とする請求項8に記載の医薬組成物：

- a) AILIMに結合する抗体またはその一部；
- b) AILIMの細胞外領域の全部または一部を含むポリペプチド；
- c) AILIMの細胞外領域の全部または一部と免疫グロブリンの重鎖の定常領域の全部または一部とからなる融合ポリペプチド；及び
- d) AILIMに結合するポリペプチド。

10. 該物質が、非蛋白性物質であることを特徴とする請求項1乃至請求項7のいずれかに記載の医薬組成物。

11. 該非蛋白性物質が、DNA、RNAまたは化学的に合成された化合物であることを特徴とする請求項10に記載の医薬組成物。

図 1

処置方法	匹数	移植肝の生着日数 (日)	平均値 (日)	検定値 (P <sup>a</sup> )
対照	6	10, 11, 11, 11, 12, 12	11.1	
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0 日目)	5	10, 10, 11, 12, 13	11.2	
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0 及び 6 日目)	5	10, 11, 11, 12, 14	11.6	
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0, 3 及び 6 日目)	7	10, 14, 16, 25, 28, 30*, 30*	>21.9	<0.001
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0, 3, 6, 9 及び 12 日目)	9	13, 16, 19, 19, 23, 25, 29, 31, 32	23	<0.001
抗 AILIM 抗体 (0.3mg/kg; 静注; 0, 3, 6, 9 及び 12 日目)	6	12, 12, 14, 17, 25, 27	17.8	<0.001
FK-506 (1mg/kg; 静注; 0 日目)	8	22, 24, 26, 30, 30*, 30*, 19*, 19*	15.5	
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0 日目) 及び FK-506 (1mg/kg; 静注; 0 日目)	8	17, 41, 47, 56, 19*, 19*, 64*, 129*	>49.0	<0.001

a: 対照群と比べた場合。      \*: さらに生着中。

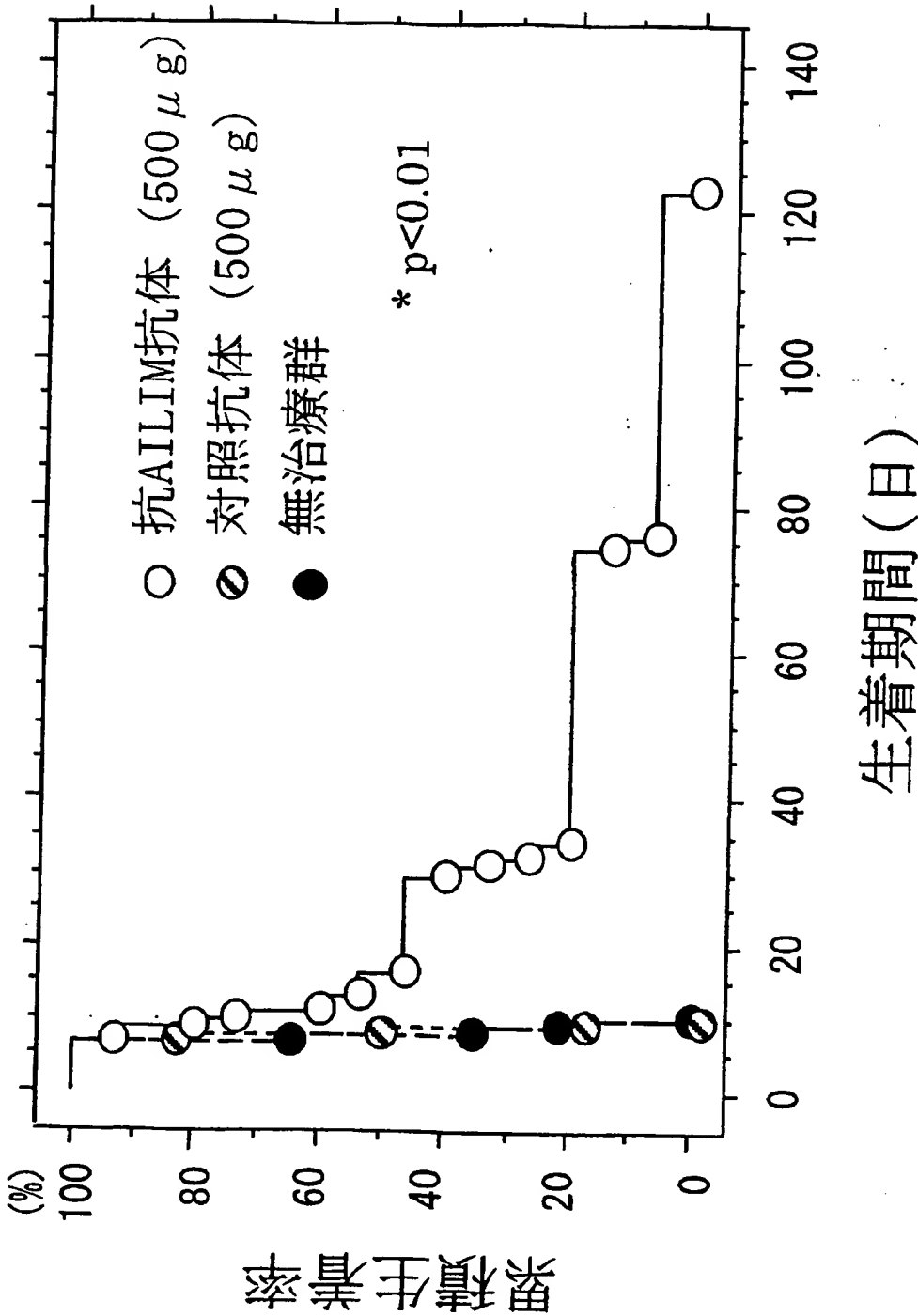
2/7

図 2

処置方法		匹数	移植肝の生着日数 (日)	中間 (日)	検定値 (P <sub>a</sub> )
対照 (未処置)		6	10, 11, 11, 11, 12, 12	11	
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0、3、6、9 及び 12 日目)		9	13, 16, 19, 19, 23, 25, 29, 31, 32	23	<0.001
FK-506 (1mg/kg; 筋注; 0 日目)		8	19, 22, 24, 26, 30, 42, 45, 91	28	<0.001
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0 日目) 及び FK-506 (1mg/kg; 筋注; 0 日目)		9	17, 35, 38, 41, 47, 56, 58, >100, >100	> 44	<0.001
抗 AILIM 抗体 (1mg/kg; 静注; 0、3 及び 6 日目) 及び FK-506 (1mg/kg; 筋注; 0 日目)		2	45, 69	57	

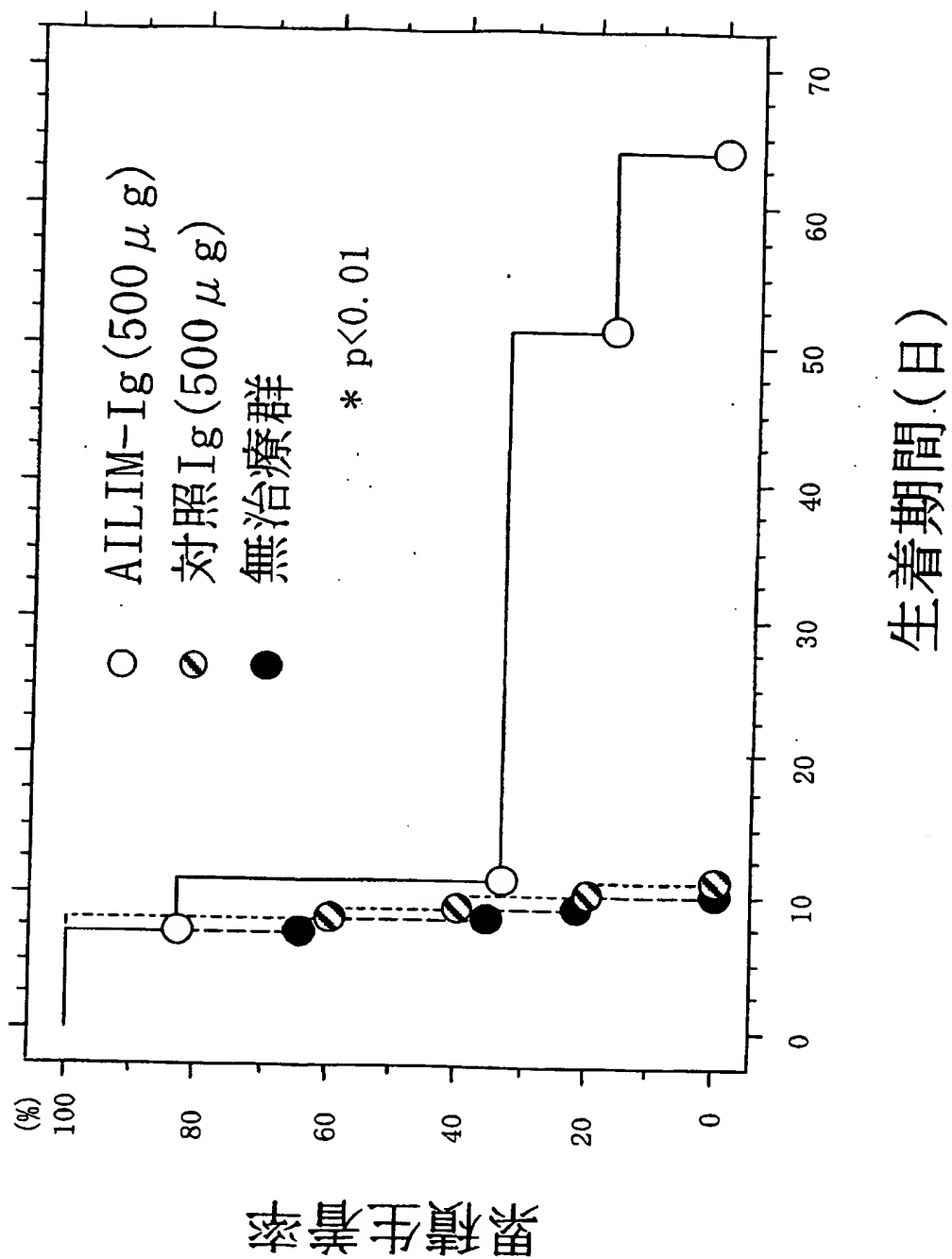


図 3



4/7

図 4



5/7

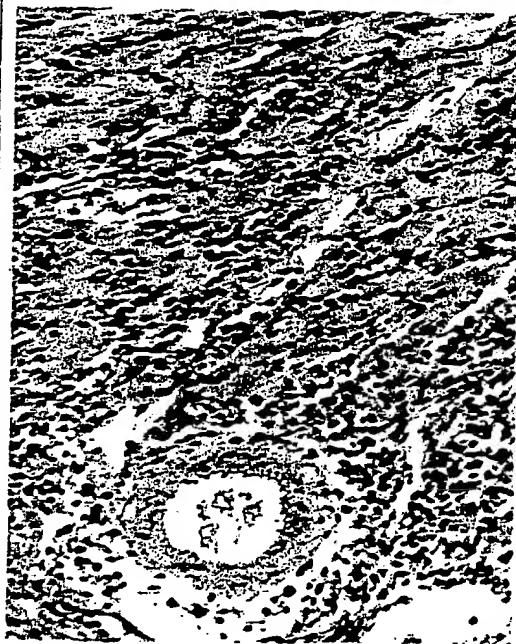
図 5

ICOS抗体投与



× 200

無治療群



× 200

図 6

処置方法	匹数	移植心の生着日数 (日)	中間 (日)	検定値 (P)
対照 (未処置)	10	5, 5, 5, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 6	6	
同系移植/未処置	4	>250, >250, >250, >250	>250	
同種移植/AdLacZ	7	6, 6, 6, 6, 7, 7, 7	6	
同種移植/AdCTLA4-Ig	10	40, 42, 58, 62, 64, 65, 68, 109, 140 <sup>a</sup> , 140 <sup>a</sup>	64	<0.001
同種移植/抗 AILIM 抗体	7	5, 5, 6, 6, 6, 6, 6	6	
同種移植/AdCTLA4-Ig + 抗 AILIM 抗体	5	>250 <sup>b</sup> , >250 <sup>b</sup> , >250 <sup>b</sup> , >250 <sup>a</sup> , >250 <sup>a</sup>	>250	<0.001

a : 皮膚移植 (primary donor-strain skin grafting)、 b : 二次心臓移植 (second set donor-strain heart grafting)

図 7

処置方法	匹数	皮膚移植(一次)		心移植(一次)		心移植(二次)		心移植(一次)	
		拒絶	生着	拒絶	生着	拒絶	生着	拒絶	生着
同種移植/AdCTLA4-Ig	2	2/2	0/2					2/2	0/2
同種移植/AdCTLA4-Ig + 抗 AILIM 抗体	5	2/2	0/2	0/3	3/3	0/5	5/5		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00930

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/52, 31/573, 38/13, 31/7056, 31/436, 31/365,  
31/16, 38/02, 39/395, 31/711, 31/7105, A61P37/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, 31/52, 31/573, 38/13, 31/7056, 31/436, 31/365,  
31/16, 38/02, 39/395, 31/711, 31/7105, A61P37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1940-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 98/38216, A1 (Japan Tobacco Inc., Japan), 03 September, 1998 (03.09.98), Whole document; especially, pages 8, 12, 16; Examples & JP 11-29599 A & EP 984023 A1	1-11
Y	WO, 98/19706, A1 (Idex Pharmaceuticals Corp., USA), 14 May, 1998 (14.05.98), Whole document & EP 1007090 A1 & JP 2001-504693 A	1-11
Y	WO, 95/33770, A1 (Repligen Corp., USA; Dana Farber Cancer Institute), 14 December, 1995 (14.12.95), Whole document & EP 764171 A1 & JP 10-505482 A	1-11
Y	JP, 2000-154151, A (Kyo JO), 06 June, 2000 (06.06.00), (Family: none) Full text; particularly, claims	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
18 March, 2002 (18.03.02)

Date of mailing of the international search report  
02 April, 2002 (02.04.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00930

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Anna TAFURI et al., ICOS is essential for effective T-helper-cell responses, Nature, Jan. 2001, Vol.409, pages 105 to 109, whole document	1-11
Y	Steven K. YOSHINAGA et al., T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS, Nature, Dec. 1999, Vol.402, pages 827 to 832, whole document	1-11
Y	Andreas HUTLOFF, ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28, Nature, Jan. 1999, Vol.397, pages 263 to 266, Whole document	1-11
Y	JP, 11-228442 (Cypros Pharmaceutical Corp.), 24 August, 1999 (24.08.99), (Family: none)	1-11
X Y	WO, 00/46240, A2 (Amgen Inc., USA), 10 August, 2000 (10.08.00), & EP 1149114 A2	1 2-11
P,X	WO, 01/15732, A1 (Japan Tobacco Inc., Japan), 08 March, 2001 (08.03.01), & EP 1125585 A1	1-11
P,X	WO, 01/87981, A2 (Japan Tobacco, Inc., Japan), 22 November, 2001 (22.11.01), & JP 2002-34581 A & EP 1158004 A2	1-11
P,X	Shu-hei OGAWA et al., Opposing Effects of Anti-Activation-Inducible Lymphocyte-Immunomodulatory Molecule/Inducible Costimulator Antibody on the Development of Acute Versus Chronic Graft-Versus-Host Disease, J. Immunol., Nov. 2001, Vol.167, No.10, pages 5741 to 5748	1-11
P,X	Kenichiro KIYONO, "Fukushigeki no Sogai ni yoru Kanyo Yudo", Igaku no Ayumi, 2001, March, Vol.196, No.13, pages 949 to 952	1-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00930

Claims 1 to 7 pertain to remedies for graft rejection comprising as the active ingredient the "substance having an activity of controlling AILIM-mediated signal transduction". Although any chemicals having this activity are involved in the scopes of claims 1 to 7, it is recognized that only small part of the claimed compounds are exclusively supported by the description under the provision of Article 6 of the PCT and disclosed therein under the provision of Article 5 of the PCT. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of the "substance having an activity of controlling AILIM-mediated signal transduction" could not be specified. Thus, claims 1 to 7 also fail to satisfy the requirement of clearness as defined in Article 6 of the PCT.

In claims 8 to 11, it is specified, concerning the above-described "substance having an activity of controlling AILIM-mediated signal transduction", that an AILIM-binding polypeptide, a protein substance having this activity, a non-protein substance having this activity and DNA and RNA having this activity are used in remedies for the above diseases. However, it is not considered that the data relating to the structures of these substances are sufficient for specifying the scope of the above chemicals. It is therefore recognized that only small part of the claimed compounds are exclusively supported by the description under the provision of Article 6 of the PCT and disclosed therein under the provision of Article 5 of the PCT.

Therefore, the search has been practiced on the relationship between the activity of controlling AILIM-mediated signal transduction and the treatment of graft rejection and on the remedies for diseases in association with graft rejection which contain the compounds specifically cited in the description as the active ingredient.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/52, 31/573, 38/13, 31/7056, 31/436,  
31/365, 31/16, 38/02, 39/395, 31/711, 31/7105,  
A61P37/06

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 31/52, 31/573, 38/13, 31/7056, 31/436,  
31/365, 31/16, 38/02, 39/395, 31/711, 31/7105,  
A61P37/06

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1992年  
日本国公開実用新案公報 1971-1992年  
日本国登録実用新案公報 1994-1996年  
日本国実用新案登録公報 1996-2002年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 98/38216 A1 (Japan Tobacco Inc., Japan) 1998.09.03 whole document, especially p.8, p.12, p.16, examples & JP 11-29599 A & EP 984023 A1	1-11
Y	WO 98/19706 A1 (Idex Pharmaceuticals Corporation, USA) 1998.0. 5.14, whole document & EP 1007090 A1 & JP 2001-504693 A	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.03.02

国際調査報告の発送日

02.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4C

9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 95/33770 A1 (Repligen Corp., USA; Dana Farber Cancer Institute) 1995.12.14, whole document & EP 764171 A1 & JP 10-505482 A	1-11
Y	JP 2000-154151 A (徐 強) 2000.06.06 (ファミリーなし) 全文、特に請求項	1-11
Y	Anna Tafuri et. al., ICOS is essential for effective T-helper-cell responses, Nature, Jan. 2001, Vol.409, pages 105-109, whole document	1-11
Y	Steven K. Yoshinaga et. al., T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS, Nature, Dec. 1999, Vol.402, pages 827-832, whole document	1-11
Y	Andreas Hutloff, ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28, Nature, Jan. 1999, Vol.397, pages 263-266, whole document	1-11
Y	JP 11-228442 (サイプロス・ファーマシューティカル・コーポレーション, Cypros Pharmaceutical Corporation) 1999.08.24 (ファミリーなし)	1-11
X Y	WO 00/46240 A2 (Amgen Inc., USA) 2000.08.10 & EP 1149114 A2	1 2-11
PX	WO 01/15732 A1 (Japan Tobacco Inc., Japan) 2001.03.08 & EP 1125585 A1	1-11
PX	WO 01/87981 A2 (Japan Tobacco, Inc., Japan) 2001.11.22 & JP 2002-34581 A & EP 1158004 A2	1-11
PX	Shu-hei Ogawa et. al., Opposing Effects of Anti-Activation-Inducible Lymphocyte-Immunomodulatory Molecule/Inducible Costimulator Antibody on the Development of Acute Versus Chronic Graft-Versus-Host Disease, J. Immunol., Nov. 2001, Vol.167, No.10, pages 5741-5748	1-11
PX	清野研一郎、副刺激の阻害による寛容誘導、医学のあゆみ、2001年3月、Vol. 196、No. 13、P. 949-952	1-11

請求の範囲1～7は、「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」を有効成分とする移植片拒絶反応の治療剤に関するものである。そして、請求の範囲1～7は、そのような性質を有する化学物質を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1～7は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

請求の範囲8～11では、上記「AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性を有する物質」を、AILIM結合ポリペプチド、そのような活性を有する蛋白性物質、そのような活性を有する非蛋白性物質、そのような活性を有するDNA、RNAを上記疾患の治療剤に用いる旨を特定しているが、これらの構造に関する情報も、化学物質の範囲を特定するには十分なものとは認められないし、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

よって、調査は、AILIMを介するシグナル伝達を制御する活性と、移植片拒絶反応の治療との関係について、及び、明細書に具体的に記載されている化合物を有効成分とする移植片拒絶反応に伴う疾患の治療剤について行った。